

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003年12月18日 (18.12.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/104454 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, 9/04, C12Q 1/68, G01N 33/50
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/07148
- (22) 国際出願日: 2003年6月5日 (05.06.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-165612 2002年6月6日 (06.06.2002) JP
特願2003-60749 2003年3月7日 (07.03.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 山之内製薬株式会社 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-8411 東京都中央区日本橋本町二丁目3番11号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 川上 政勝 (KAWAKAMI, Masakatsu) [JP/JP]; 〒305-8585 茨城県つくば市御幸が丘2-1 山之内製薬株式会社内 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: 長井 省三, 外 (NAGAI, Shozo et al.); 〒174-8612 東京都板橋区蓮根三丁目17番1号 山之内製薬株式会社 特許部内 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL OXIDASE

(54) 発明の名称: 新規オキシダーゼ

(57) Abstract: It is intended to disclose an oxidase gene which is useful in diagnosing RA and screening a substance for treating RA and/or a substance for treating arthritis deformans. It is also intended to disclose an examination method which is useful as a method of diagnosing RA. Further, it is intended to disclose a method of screening a substance for treating RA and/or a substance for treating arthritis deformans with the use of the novel oxidase gene as described above. It is furthermore intended to provide a process for producing a medicinal composition of a substance for treating RA and/or a substance for treating arthritis deformans, which can be obtained by the screening method as described above, containing an inhibitor for the above oxidase as the active ingredient.

(57) 要約: RAの診断、RA治療用物質及び／又は変形性関節炎治療用物質のスクリーニングに有用なオキシダーゼ遺伝子を開示する。また、RA診断法として有用な検査方法を開示する。更に、前記新規オキシダーゼ遺伝子を利用することによるRA治療用物質及び／又は変形性関節炎治療用物質をスクリーニングする方法を開示する。また、前記スクリーニング方法により得ることができる、前記オキシダーゼ阻害剤を有効成分とするRA治療用物質及び／又は変形性関節炎治療用医薬組成物の製造方法を開示する。

WO 03/104454 A1

明 細 書

新規オキシダーゼ

技術分野

本発明は、新規なオキシダーゼであるポリペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクター、該ベクターを含有する形質転換細胞、関節リウマチ（RA と略す）診断に有用な検査方法及び RA 治療用物質及び／又は変形性関節炎治療用物質のスクリーニング方法に関する。

背景技術

ニコチンアミド-アデニンジヌクレオチドリニン酸（NADPH）オキシダーゼは NADPH から電子を受け取り、それを最終的に酸素分子に渡して活性酸素種（ROS と略す）を生成する酵素である。生理的には主に食細胞に存在する前記酵素は微生物等の異物の侵入に対し、ROS を生成し殺菌するような生体防御に重要な働きをしている。しかし、この酵素による ROS の過剰な生成はタンパク質、DNA の切断や過酸化脂質による膜の損傷などを引き起こし、細胞および組織の障害、ひいては炎症性疾患、血管病、神経変性疾患、癌、心疾患などをはじめとする様々な疾患の原因となることが知られている（非特許文献 1、非特許文献 2 参照）。しかしながら、ROS を生成する NADPH オキシダーゼはその発現が全身性に分布するため、創薬の標的としては副作用が懸念されていた。

一方、最近の研究により非食細胞に存在する NADPH オキシダーゼファミリー、NOX1 が同定され、食細胞以外にも ROS が組織特異的に生成されていることが報告された（非特許文献 3 参照）。NOX1 は大腸に多量に存在し、細胞増殖や様々な遺伝子発現誘導を引き起こすことが報告され、大腸における様々な疾患に関わることを示唆されている。

NOX1 と高い相同性を有するアミノ酸配列及び該配列をコードする塩基配列については種々の報告がある。データベースにおいてアクセッション番号 AF166328

(GENPEPT)、AJ438989 (GENPEPT)、HSA438989 (GENBANK)、AF127763 (GENPEPT)、AF166327 (GENPEPT)、Q9Y5S8 (SWISSPROT)、及び Q9WV87 (SWISSPROT)として登録され、非特許文献4、特許文献1、特許文献2に報告されている。これらの文献には当該分子は大腸癌の診断、大腸癌治療薬の開発に有用である等、大腸に存在し機能する因子として記載されている。特許文献3には、NOX1と相同性の高い配列が記載され、当該配列が活性酸素の産生に関わること、癌、前立腺肥大症等の異常細胞増殖に関わる疾患の治療に有用であることが記載されている。

RAは滑膜組織に病変の主座を持ち、関節の発赤、腫脹、熱感、疼痛、運動制限、および破壊をもたらす原因不明の慢性炎症性疾患である。RAの滑膜組織では、インターロイキン-1 (interleukin-1、IL-1)、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-8 (IL-8)、インターロイキン-12 (IL-12)、インターロイキン-15 (IL-15)、インターロイキン-18 (IL-18)、腫瘍壊死因子 α (tumor necrosis factor- α 、TNF- α)などの炎症性サイトカイン、一酸化窒素 (nitric oxide、NO)、プロスタグランジン (prostaglandins、PGs)などの過剰産生が知られている(非特許文献5参照)。近年、モノクローナル抗体、可溶性受容体などを用い、IL-1、IL-6やTNF- α を標的とした治療法が開発されその有効性が注目を集めている(非特許文献6参照)。しかし、従来の治療標的分子を機序とする治療法では完全寛解導入には至らない患者群が存在する(非特許文献7参照)。従って、既存の報告とは異なる新しい治療標的分子の同定が望まれている。

ROSは酸化還元制御を介して(非特許文献8参照)、様々な分子を発現誘導する転写因子であるNF κ Bを活性化することが知られている。NF κ Bにより発現誘導を受ける分子のうち炎症性サイトカインとして知られるTNF α は抗RA薬の標的として(非特許文献9参照)、プロスタグランジンの合成酵素として知られるCOX-2はRAや変形性関節炎の治療薬の標的として広く臨床においても認知されている(非特許文献10参照)。

一方、米国の大学からRAの分類に関する基準が定義されているが(非特許文献11参照)、これらの基準は単なるランドマークであり、その病状パターンが多様であるため、RAの診断、特に定量的かつ簡便な診断は困難であるとされてきた。

定量的かつ簡便な RA の診断方法が待望されている。

(特許文献1) 国際公開W002/06515号パンフレット

(特許文献2) 国際公開W001/96390号パンフレット

(特許文献3) 国際公開W000/28031号パンフレット

(非特許文献1) 「トレンド・イン・ファーマコロジカル・サイエンス(Trends In Pharmacological Science)」, (米国), 2000年, 第21巻, p.119-120

(非特許文献2) 「フェデレーション・オブ・ヨーロッパ・バイオケミカル・ソサエティー(Federation of European Biochemical Society)」, (独国), 1991年, 第281巻, p.9-19

(非特許文献3) 「ネイチャー(Nature)」, (英国), 1999年, 第401巻, p.79-82

(非特許文献4) 「サイエンス(Science)」, (米国), 2000年, 第287巻, p.138

(非特許文献5) 「ザ・ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン(The Journal of Experimental Medicine)」, (米国), 1991年, 第173巻, p.569-574

(非特許文献6) 「カレント・ファーマシューティカル・バイオテクノロジー(Current Pharmaceutical Biotechnology)」, (米国), 2000年, 第1巻, p.217-233

(非特許文献7) 「ネイチャー・レビューズ・イムノロジー(Nature Reviews Immunology)」, (英国), 2002年, 第2巻, p.364-371

(非特許文献8) 「ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカルケミストリー(The Journal of Biologicalchemistry)」, (米国), 1993年, 第268巻, p.11380-11388

(非特許文献9) 「アースライティス・アンド・リウマチズム(Arthritis & Rheumatism)」, (米国), 1999年, 第36巻, p.1681-1690

(非特許文献10) 「アースライティス・アンド・リウマチズム(Arthritis & Rheumatism)」, (米国), 1998年, 第41巻, p.1591-1602

(非特許文献11) ジュー・アックスフォード(J. Axford)編, 「メディシン(Medicine)」, (米国), ブラックウエルサイエンス(Blackwell Science), 1996年, p3.18-3.22

発明の開示

本発明者は、鋭意研究を重ねた結果、ヒト RA 患者由来滑膜細胞から新規なオキシダーゼ (NOX1-b と称する) 遺伝子全長配列を取得することに成功した。さらに、NOX1-b 遺伝子は、健常人由来滑膜細胞には発現しておらず、RA 患者由来滑膜細胞に特異的に発現していることを見出し、NOX1-b 特異的なポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) プライマーを用いることにより RA 診断法として有用な検査方法を可能にした。加えて、NOX1-b 遺伝子を利用することにより RA 治療用物質及び／又は変形性関節炎治療用物質のスクリーニング方法を構築した。NOX1-b が発現していない細胞に比較して NOX1-b が発現している細胞において、RA や変形性関節症治療薬の標的として知られる COX-2 及び RA 治療薬の標的として知られる TNF α の発現が有為に亢進していること、また、この COX-2 及び TNF α の発現亢進は NOX1-b 阻害剤により阻害されることを明らかにした。これらの結果、新規オキシダーゼ NOX1-b、RA の診断に有用な検査方法及び RA 治療用物質及び／又は変形性関節炎治療用物質のスクリーニング方法を提供し本発明を完成した。

すなわち本発明は、

- [1] (1) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、関節リウマチ患者特異的に発現するポリペプチド、あるいは、(2) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が欠失、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、関節リウマチ患者特異的に発現するポリペプチド、
- [2] 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、
- [3] [1] または、[2] に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、
- [4] [3] に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター、
- [5] [4] に記載の発現ベクターで形質転換された細胞、
- [6] (1) 被験者における、
 - i) [3] に記載の塩基配列を含む遺伝子、又は
 - ii) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列との相同性が95%以上であるアミノ酸

配列を含み、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列を含む遺伝子の発現レベルを測定する工程、及び

(2) 健常者における前記遺伝子の発現レベルと比較する工程を含むことを特徴とする、関節リウマチの検査方法、

[7] i) [3] に記載の塩基配列を含む遺伝子、又は
ii) 配列番号2で表されるアミノ酸配列との相同性が95%以上であるアミノ酸配列を含み、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列を含む遺伝子
を特異的に増幅できるように設計した順方向及び逆方向プライマーを含む関節リウマチ検査用キット、

[8] (1) [1] 若しくは[2] に記載のポリペプチド、又は配列番号2で表されるアミノ酸配列との相同性が95%以上であるアミノ酸配列を含み、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチドを発現している細胞に試験物質を接触させる工程、(2) 前記ポリペプチドの活性が抑制されるか否かを分析する工程、及び(3) 前記ポリペプチドの活性を抑制する物質を選択する工程を含むことを特徴とする、前記ポリペプチドの活性を抑制する物質をスクリーニングする方法、

[9] [1] 若しくは[2] に記載のポリペプチド、又は配列番号2で表されるアミノ酸配列との相同性が95%以上であるアミノ酸配列を含み、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチドの活性を抑制する物質が関節リウマチ治療用物質及び／又は変形性関節炎治療用物質である、[8] 記載のスクリーニングする方法、

[10] [8] 又は[9] に記載のスクリーニング方法を用いてスクリーニングする工程、及び
前記スクリーニングにより得られた物質を用いて製剤化する工程を含むことを特徴とする、RA 治療用及び／又は変形性関節炎治療用医薬組成物の製造方法
に関する。

配列番号 2 からなる NOX1-b の全長アミノ酸配列及び該配列をコードする塩基配列と同一な配列に関する報告はないが、高い相同性を有するアミノ酸配列及び該配列をコードする塩基配列については種々の報告がある。データベース GENPEPT 及び GENBANK においてアクセッション番号 AF166328 として本発明の NOX1-b 配列と 1 アミノ酸、1 塩基異なる配列が登録されている。また、データベース GENPEPT 及び GENBANK においてアクセッション番号 AJ438989 及び HSA438989 として本発明の NOX1-b 配列と 2 アミノ酸、4 塩基異なる配列が登録されている。しかしながら、いずれにもこれらの配列からなる蛋白質が RA 患者の滑膜に発現することや RA 治療の標的になることを示唆する記載はない。本発明のポリペプチドと高い相同性を有する蛋白質（配列番号 2 の第 432 番と第 433 番の間に 49 アミノ酸が挿入）がデータベース GENPEPT においてアクセッション番号 AF127763、AF166327、データベース SWISSPROT においてアクセッション番号 Q9Y5S8、Q9WV87 として登録され、Science287 : 138 (2000)、Nature401:79 (1999)、W002/06515 に報告されている。また、本発明のポリペプチドと高い相同性を有する蛋白質（配列番号 2 の第 80 番と第 81 番の間に 16 アミノ酸が挿入、第 432 番と第 433 番の間に 49 アミノ酸が挿入）が W001/96390 に報告されている。しかしながら、これらの文献には当該分子は大腸癌の診断、大腸癌治療薬の開発に有用である等、大腸に存在し機能する因子として記載されており、RA との関連については記載されていない。W000/28031 には、本発明のポリペプチドと高い相同性を有する蛋白質（配列番号 2 の第 432 番と第 433 番の間に 49 アミノ酸が挿入）が記載され、当該配列が活性酸素の産生に関わることが記載されている。前記蛋白質は大腸に特異的に高発現し、癌、前立腺肥大症などの異常細胞増殖に関わる疾患の治療に有用であることが記載されている。RA は滑膜で診断する必要があるが、当該国際公開パンフレットでは滑膜組織における前記蛋白質の発現は確認しておらず、RA 患者特異的に発現しているか否かも確認していない。更には、前記蛋白質が、RA の原因である TNF α 及び COX-2 発現量を亢進させるか否かも確認しておらず、RA の検査や RA 治療の標的として有用であるという情報はない。

従って、本発明のポリペプチドが健常人由来滑膜には存在せず RA 患者由来滑膜に特異的に存在すること、本発明のポリペプチドが RA 治療の標的となること

は本発明者が初めて見出した知見であり、更には、これらを用いることにより RA を検査する方法、RA 治療用物質をスクリーニングする方法は本願発明者が初めて行った発明である。

図面の簡単な説明

図1は、RA患者由来滑膜細胞におけるNOX1-b mRNAの発現上昇を示す図である。

図2は、NOX1-bのROS産生活性及びDPIIによる阻害を示す図である。

図3は、NOX1-b発現細胞におけるCOX-2 mRNAの発現上昇とDPIIによる阻害を示す図である。

図4は、NOX1-b発現細胞におけるTNF- α mRNAの発現上昇とDPIIによる阻害を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本明細書において、「RA」は「関節リウマチ」の略語として用いる。従来RAの日本語訳は「慢性関節リウマチ」であったが、2002年の日本リウマチ学会においてRAの日本語訳を「慢性関節リウマチ」から「関節リウマチ」と変更するとの発表がなされているので、本明細書ではそれに従った。

<本発明のポリペプチド及びポリヌクレオチド>

本発明のポリペプチドには、

- (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；
 - (2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチド、あるいは、配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が欠失、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチド；（以下、機能的等価改変体と称する）
- が含まれる。

「本発明の機能的等価改変体」としては、「配列番号2で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチド」、あるいは、「配列番

号2で表されるアミノ酸配列において、1～10個、好ましくは1～7個、より好ましくは1～5個のアミノ酸が欠失、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチド」が好ましい。

以上、本発明のポリペプチドについて説明したが、配列番号2で表されるアミノ酸からなるポリペプチド及び本発明の機能的等価改変体を総称して、以下、「本発明のポリペプチド」と称する。「本発明のポリペプチド」のうち、配列番号2で表されるアミノ酸からなるポリペプチドである蛋白質を「NOX1-b蛋白質」と称する。

本発明のポリペプチドとしては、「配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド」、「配列番号2で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチド、あるいは、配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1～10個、好ましくは1～7個、より好ましくは1～5個のアミノ酸が欠失、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチド」が好ましく、「配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド」がより好ましい。

また、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号2記載のアミノ酸配列で示されるNOX1-b蛋白質、その機能的等価改変体をコードする塩基配列なら何れでもよい。好ましくは、配列番号2記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドであり、さらに好ましくは、配列番号1記載の塩基配列である。

本発明のポリヌクレオチドの製造方法は、特に限定されるものではないが、例えば、(1) PCRを用いた方法、(2) 常法の遺伝子工学的手法（すなわち cDNAライブラリーで形質転換した形質転換株から所望のアミノ酸を含む形質転換株を選択する方法）を用いる方法、又は(3) 化学合成法などを挙げることができる。各製造方法については、新規酵素の発明を開示した W001/34785 の記載と同様に実施できる。ただし、上記特許出願明細書における「本発明の新規蛋白」を本発明のポリペプチド（例えば NOX1-b 蛋白質）、「本発明の遺伝子」を本発明のポリヌクレオチド（例えば NOX1-b）と読み替える。詳細には、

PCR を用いた方法では、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」1) 蛋

白質遺伝子の製造方法 a) 第 1 製造法に記載された手順により、本発明のポリヌクレオチドを製造することができる。本発明の蛋白質を産生する能力を有する細胞あるいは組織、例えば、ヒト RA 患者由来滑膜から mRNA を抽出する。次いで、この mRNA をランダムプライマーまたはオリゴ dT プライマーの存在下で、逆転写酵素反応を行い、第一鎖 cDNA を合成することが出来る。得られた第一鎖 cDNA を用い、目的遺伝子の一部の領域をはさんだ 2 種類のプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) に供し、本発明のポリヌクレオチドまたはその一部を得ることができる。より具体的には、例えば配列番号 5 及び配列番号 6 で表される配列をプライマーとして、実施例 1 に記載の方法により目的遺伝子を増幅する。ついで、増幅した遺伝子が RA 患者特異的に発現しているか否かを例えば実施例 4 に記載の方法により確認し、健常人に比して RA 患者特異的に発現している遺伝子を本発明のポリヌクレオチドとして選択することが出来る。

常法の遺伝子工学的手法を用いる方法では、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」 1) 蛋白質遺伝子の製造方法 b) 第 2 製造法に記載された手順により、本発明のポリヌクレオチドを製造することができる。

化学合成法を用いた方法では、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」 1) 蛋白質遺伝子の製造方法 c) 第 3 製造法、d) 第 4 製造法に記載された方法によって、本発明のポリヌクレオチドを製造することができる。

本発明の発現ベクター、宿主細胞、蛋白質の製造方法は、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」 2) 本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明の組換え蛋白の製造方法に記載された方法により実施できる。より具体的には、本発明の発現ベクターはほ乳類動物細胞の発現ベクター pcDNA3.1/HisB を用い実施例 2 に記載の方法で、本発明の宿主細胞及び蛋白質は NIH3T3 細胞をトランスフェクション試薬で形質転換する実施例 3 に記載の方法で製造できる。

本発明のポリヌクレオチドは、それ自体後述の RA の検査方法においてハイブリダイズプローブとして用いることができ、RA の検査に有用である。また、本発明のポリペプチドは、本発明のポリペプチドを特異的に認識する抗体の作製や、発現レベルを検出及び／又は定量する際のコントロールとして用いることができる。

<RA の検査方法／RA 検査用キット>

後述のように、健常者由来のサンプルには NOX 1-b が発現しておらず、RA 患者由来のサンプルに特異的に NOX 1-b が発現していることを見出したことから、この発現を利用して RA 疾患を検出することが出来る。具体的には、次の工程を含む態様が例示される。すなわち、

[1] 被験者における、

(1) 本発明のポリヌクレオチドの塩基配列を含む遺伝子（すなわち、i）配列番号2で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチド、i i）配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が欠失、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチド、又はi i i）配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列を含む遺伝子）、又は

(2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列との相同性が95%以上であるアミノ酸配列を含み、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列を含む遺伝子の発現レベルを測定する工程、及び

[2] 健常者における前記遺伝子の発現レベルと比較する工程、である。

前記(2)における「配列番号2で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列を含み、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチド」を「本発明における相同ポリペプチド」と称する。本発明における相同ポリペプチドは、「配列番号2で表されるアミノ酸配列との相同性が95%以上であるアミノ酸配列を含み、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチド」である限り、特に限定されるものではないが、該相同性が、好ましくは97%以上、更に好ましくは99%以上であるアミノ酸配列を含むポリペプチドが好ましい。

なお、本明細書における前記「相同性」とは、BLAST (Basic local alignment search tool; Altschul, S. F. ら, J. Mol. Biol., 215, 403-410, 1990) 検索により得ら

れたIdentities値を意味する。なお、パラメーターでは、ペアワイズアラインメントパラメーターとして、

「プログラム名」として「blastp」を、

「Gap挿入Cost値」を「0」で、

「Gap伸長Cost値」を「0」で、

「Matrix」として「BLOSUM62」を、

それぞれ使用する。

本発明における相同ポリペプチドは、本発明のポリペプチドと同様の製造方法により製造できる。本発明のポリペプチドと本発明における相同ポリペプチドとを併せて本発明のスクリーニング用ポリペプチドと称する。本発明のスクリーニング用ポリペプチドとしては、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドが特に好ましい。

本発明のRAの検査方法における遺伝子の発現レベルとは、該遺伝子のmRNAへの転写、並びに蛋白質への翻訳を含む。従って、本発明によるRAの検査方法は、本発明のスクリーニング用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えばNOX 1-b遺伝子）に対応するmRNAの発現レベル、または、該遺伝子によってコードされる蛋白質の発現レベルの比較に基づいて行われる。

工程[1]における遺伝子（例えばNOX 1-b遺伝子）の発現レベルを測定する方法は公知の遺伝子解析法に従って実施することが出来る。例えば、NOX 1-b遺伝子にハイブリダイズする核酸をプローブとしたハイブリダイゼーション技術、または、NOX 1-b遺伝子にハイブリダイズするDNAをプライマーとした遺伝子増幅技術等を利用することが出来る。具体的には、被験者から得た滑膜細胞由来の核酸、例えばmRNA等を用いて測定することが出来る。mRNA量の測定は、本発明のスクリーニング用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えばNOX 1-b配列）を特異的に増幅できるように設計したプライマーを用いて遺伝子増幅反応方法にて測定できる。遺伝子増幅反応方法としては、特に限定されないが、PCR法、RNAポリメラーゼを利用した核酸増幅法などを利用することが出来る。より具体的には、実施例4に記載の方法により実施できる。本発明のRAの検査方法に用いられるプライマー、または、RA検査用キットに含まれるプライマーは、本発明の

スクリーニング用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えばNOX 1-b配列）を特異的に増幅できるものであれば、特には限定されず、本発明のスクリーニング用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えばNOX1-b塩基配列）に基づいて設計できる。好ましくは、配列番号5及び配列番号6に記載されたオリゴヌクレオチドである。

ハイブリダイゼーション技術を利用したRAの検査は、例えば、ノーザンハイブリダイゼーション、ドットブロット法、DNAマイクロアレイ法などを使用して行うことが出来る。さらには、RT-PCR等の遺伝子増幅技術を利用することにより実施できる。RT-PCR法においては、遺伝子の増幅過程においてPCR増幅モニター（リアルタイムPCR）法を用いることにより、本発明のスクリーニング用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子（例えばNOX 1-b遺伝子）の発現について、より定量的な解析を行うことが可能である。PCR増幅モニター法としては、例えば、ABI PRISM7700（アプライドバイオシステムズ社）を用いることが出来る。

また、工程[1]において、本発明のスクリーニング用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列を含む遺伝子の発現レベルを測定する方法として、発現レベルを本発明のスクリーニング用ポリペプチドからなる蛋白質、好ましくは、NOX 1-b蛋白質の検出によって測定する方法が可能である。このような検査方法としては、例えば、被験者から得た滑膜細胞由来の細胞抽出液を用いて、本発明のスクリーニング用ポリペプチドからなる蛋白質、好ましくはNOX 1-b蛋白質に結合する抗体、より好ましくはNOX1-bに特異的に結合する抗体を利用したウエスタンブロッティング、免疫沈降法、ELISA法などを利用することが出来る。

工程[2]においては、工程[1]で得られた発現レベルと健常者における発現レベルと比較するのであれば、比較方法は特に限定されず、例えば実施例4に記載の方法で比較できる。

本発明のRA検査用キットには、少なくとも、本発明のスクリーニング用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを特異的に増幅できるように設計した順方向及び逆方向プライマーが含まれる。順方向及び逆方向プライマー対の例としては、配列番号5及び配列番号6に記載の塩基配列で表されるプライマーが挙げら

れる。本発明のRA検査用キットに含めることが出来る他の試薬としては、PCRを行うのに必要な試薬（例えば、Taqポリメラーゼ、ヌクレオチド基質、緩衝液など）などを挙げることができる。

<本発明のスクリーニングする方法>

本発明のスクリーニングする方法には、本発明のスクリーニング用ポリペプチドの活性を抑制する物質をスクリーニングする方法と、RA治療用物質及び／又は変形性関節炎治療用物質をスクリーニングする方法とが含まれる。

（１）本発明のスクリーニング用ポリペプチドの活性を抑制する物質をスクリーニングする方法

本発明のスクリーニング用ポリペプチドの活性を抑制する物質のスクリーニング方法は、下記工程（i）～（iii）を含む限り、特に限定されるものではない：

（i）本発明のスクリーニング用ポリペプチドを発現している細胞に試験物質を接触させる工程、

（ii）前記ポリペプチドの活性が抑制されるか否かを分析する工程、及び

（iii）前記ポリペプチドの活性を抑制する物質を選択する工程。

好ましくは実施例５に記載の方法により本発明のスクリーニング用ポリペプチドの活性を抑制する物質をスクリーニングすることができる。

（２）RA治療用物質及び／又は変形性関節炎治療用物質をスクリーニングする方法

背景技術の欄で述べたように炎症性サイトカインとして知られる $\text{TNF } \alpha$ は RA 治療薬の標的として、プロスタグランジンの合成酵素として知られる COX-2 は RA や変形性関節炎の治療薬の標的として広く臨床においても認知されている。

従って、 $\text{TNF } \alpha$ 又は COX-2 の発現量を減少させる物質を選択することにより、RA 治療用物質及び／又は変形性関節炎治療用物質をスクリーニングすることができる。後述の実施例に示す様に、本発明のポリペプチドの一つである NOX1-b を発現する細胞において COX-2 発現量及び $\text{TNF } \alpha$ 発現量が有意に亢進していることが明らかとなった（実施例６及び実施例７）。また、この COX-2 発現誘導及び $\text{TNF } \alpha$ 発現誘

導がNOX1-bの阻害剤であるDPIにより阻害されたことから、本発明のポリペプチドの一つであるNOX1-b由来のROSによる酸化還元制御を介してCOX-2及びTNF α が発現誘導されていると考えられた。本発明のポリペプチドの活性を抑制することによりCOX-2発現及び／又はTNF α の発現誘導が抑制されるという本発明者らが見出した新規な知見から、本発明のスクリーニング用ポリペプチドの活性を抑制する物質は、RA治療効果を有すると考えられた。即ち、本発明のスクリーニング用ポリペプチドの活性を抑制する物質をスクリーニングする方法は、RA治療用物質及び／又は変形性関節炎治療用物質をスクリーニングする方法として利用できる。

本発明のRA治療用物質及び／又は変形性関節炎治療用物質をスクリーニングする方法は、下記工程 (i) ~ (iii) を含む限り、特に限定されるものではない：

(i) 本発明のスクリーニング用ポリペプチドを発現している細胞に試験物質を接触させる工程、

(ii) 前記ポリペプチドの活性が抑制されるか否かを分析する工程、及び

(iii) 前記ポリペプチドの活性を抑制する物質を選択する工程。

上記スクリーニング方法で得られた物質を、RA治療剤に関する公知の評価系あるいは、それを改良した評価系にかけることにより、RA治療用物質として有用な物質であるか否かを判定することができる。例えば、RA治療作用の確認は、コラーゲン誘発関節炎モデルマウス (Fiona H. Durisら, Clin. Immunol. Immunopathol., 73, 11-18, 1994) を用いる方法により行なうことができる。また、上記スクリーニング方法で得られた物質を、変形性関節炎治療剤に関する公知の評価系にかけることにより、変形性関節炎治療用物質として有用な物質であるか否かを判定することができる。

本発明のスクリーニングする方法として、本発明のスクリーニング用ポリペプチドの活性を分析 (測定又は検出) するために用いる方法の違いに基づいて、例えば、

- (a) 化学-生化学的方法
- (b) 化学発光法
- (c) 電子スピン共鳴分光 (ESR) 法

などを挙げることができる。各スクリーニング方法について以下に説明する。

(a) 化学-生化学的方法

本発明のスクリーニング用ポリペプチドの活性を抑制する物質、RA治療用物質及び／又は変形性関節炎治療用物質は、化学-生化学的方法を利用してスクリーニングすることができる。化学-生化学的方法としては、例えば(i)のシトクロムC還元法を利用したスクリーニング方法、(ii)ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)の還元を利用したスクリーニング方法、(iii)水溶性テトラゾリウム塩の還元を利用したスクリーニング方法を挙げることができる。シトクロムC還元法による検出は酸化型シトクロムCが還元されると550 nmに強い吸収をもつ還元型に変わることを利用したものである(J. M. McCord and I. Fridovich, J. Biol. Chem., 244, 6049(1969))。NBT還元法はNBTが O_2^- により還元され水不溶性のブルーホルマザン(吸収極大560nm)を生じることを利用したものである(C. Beauchamp and I. Fridovich, Anal. Biochem., 44, 276 (1971))。

本発明のスクリーニング用ポリペプチドを発現させた細胞を調製する。試験物質を添加し、更にプローブ(例えばシトクロムC)を適量添加して一定時間インキュベーションする。反応後、550nmの吸光度を測定する。試験物質を添加した場合に、還元型への転換が抑制されれば、前記試験物質は、本発明のスクリーニング用ポリペプチドの活性を抑制する物質であると判定することができる。本方法のうちの一つであるシトクロムC還元法を利用したスクリーニング方法は、実施例5に記載の条件で実施することが好ましい。本発明のスクリーニング用ポリペプチドの活性を抑制する物質としては、10 μ M以下、好ましくは1 μ M以下、更に好ましくは0.1 μ M以下のものを選択することが好ましい。

(b) 化学発光法

化学発光法としては、例えば(i)ウミホタルルシフェリン誘導体を利用したスクリーニング法、(ii)ルミノール法を利用したスクリーニング法を挙げることができる。ウミホタルルシフェリン誘導体は中性付近の水溶液で O_2^- と反応して励起カルボニル体を生じ、それが基底状態に遷移する過程で380nmに強く発光することを利用したものである(Goto, T: Pure Appl Chem, Vol7, 421-441, 1968)。ルミノール法による検出はアルカリ水溶液で、 O_2^- または H_2O_2 の存在下で

HOCl 、 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 、 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 、 Fe^{2+} 塩、 Co^{3+} などにより酸化されてアミノフタル酸ジアニオン（励起状態）を生じ、それが基底状態に遷移する過程で発光することを利用したものである（Roswell, D.F. et al: Method in Enzymology, Vol 5, 409-423, 1972）。

本発明のスクリーニング用ポリペプチドを発現させた細胞を調製する。試験物質を添加し、更にプローブ（例えばウミホタルルシフェリン誘導体）を適量添加して一定時間作用させる。反応後、380nmの発光を測定する。試験物質を添加した場合に、発光が抑制されれば、前記試験物質は、本発明のスクリーニング用ポリペプチドの活性を抑制する物質であると判定することができる。本発明のスクリーニング用ポリペプチドの活性を抑制する物質としては、 $10\mu\text{M}$ 以下、好ましくは $1\mu\text{M}$ 以下、更に好ましくは $0.1\mu\text{M}$ 以下のものを選択することが好ましい。

（c）電子スピン共鳴分光（ESR）法

O_2^- のESRシグナルは、スピントラップ法を用いることで間接的に測定することができる。つまりESR法は短い寿命のラジカル種をトラップ剤と反応させ、生成する安定なラジカルとし、そのESRスペクトルを解析することを利用したものである。現在用いられている最も汎用性の高いスピントラップ剤は5, 5-ジメチル-1-ピロリン-N-オキシド（DMP0）である（Y. Noda, K. Anzai, A. Mori, M. Kohno, M. Shinmei and L. Packer, Biochem. Mol. Biol. Int., 42, 35 (1997)）。

本発明のスクリーニング用ポリペプチドを発現させた細胞を調製する。試験物質を添加し、更にスピントラップ剤（例えばDMP0）を適量添加して一定時間作用させる。反応後、ラジカル付加体のスペクトル解析をする。試験物質を添加した場合に、ラジカル付加体のシグナルが抑制されれば、前記試験物質は、本発明のスクリーニング用ポリペプチドの活性を抑制する物質であると判定することができる。本発明のスクリーニング用ポリペプチドの活性を抑制する物質としては、 $10\mu\text{M}$ 以下、好ましくは $1\mu\text{M}$ 以下、更に好ましくは $0.1\mu\text{M}$ 以下のものを選択することが好ましい。

本発明のスクリーニング方法によって選択対象とする試験物質としては、特に限定されるものではないが、例えば、ケミカルファイルに登録されている種々の公知化合物（ペプチドを含む）、コンビナトリアル・ケミストリー技術（

Terrett, N. K. ら, Tetrahedron, 51, 8135-8137, 1995) によって得られた化合物群、あるいは、ファージ・ディスプレイ法 (Felici, F. ら, J. Mol. Biol., 222, 301-310, 1991) などを用いて作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物、植物、海洋生物、又は動物由来の天然成分（例えば、培養上清又は組織抽出物）などもスクリーニングの試験物質として用いることができる。更には、本発明のスクリーニング方法により選択された化合物（ペプチドを含む）を、化学的又は生物学的に修飾した化合物（ペプチドを含む）を用いることができる。

＜RA治療用及び／又は変形性関節炎治療用医薬組成物の製造方法＞

本発明には、本発明のスクリーニングする方法を用いてスクリーニングする工程、及び前記スクリーニングにより得られた物質を用いて製剤化する工程を含むことを特徴とする、RA治療用及び／又は変形性関節炎治療用医薬組成物の製造方法が包含される。

本発明のスクリーニングする方法により得られる物質を有効成分とする製剤は、前記有効成分のタイプに応じて、それらの製剤化に通常用いられる担体、賦形剤、及び／又はその他の添加剤を用いて調製することができる。

投与としては、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、又は経口用液剤などによる経口投与、あるいは、静注、筋注、若しくは関節注などの注射剤、坐剤、経皮投与剤、又は経粘膜投与剤などによる非経口投与を挙げることができる。特に胃で消化されるペプチドにあつては、静注等の非経口投与が好ましい。

経口投与のための固体組成物においては、1又はそれ以上の活性物質と、少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば、乳糖、マンニトール、ブドウ糖、微結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、又はメタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどと混合することができる。前記組成物は、常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば、滑沢剤、崩壊剤、安定化剤、又は溶解若しくは溶解補助剤などを含有することができる。錠剤又は丸剤は、必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質などのフィルムで被覆す

ることができる。

経口のための液体組成物は、例えば、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、又はエリキシル剤を含むことができ、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば、精製水又はエタノールを含むことができる。前記組成物は、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば、湿潤剤、懸濁剤、甘味剤、芳香剤、又は防腐剤を含有することができる。

非経口のための注射剤としては、無菌の水性若しくは非水性の溶液剤、懸濁剤、又は乳濁剤を含むことができる。水溶性の溶液剤又は懸濁剤には、希釈剤として、例えば、注射用蒸留水又は生理用食塩水などを含むことができる。非水溶性の溶液剤又は懸濁剤の希釈剤としては、例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油（例えば、オリーブ油）、アルコール類（例えば、エタノール）、又はポリソルベート80等を含むことができる。前記組成物は、更に湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解若しくは溶解補助剤、又は防腐剤などを含むことができる。前記組成物は、例えば、バクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合、又は照射によって無菌化することができる。また、無菌の固体組成物を製造し、使用の際に、無菌水又はその他の無菌用注射用媒体に溶解し、使用することもできる。

投与量は、有効成分、すなわち、本発明のスクリーニング方法により得られる物質の活性の強さ、症状、投与対象の年齢、又は性別等を考慮して、適宜決定することができる。

例えば、経口投与の場合、その投与量は、通常、成人（体重60kgとして）において、1日につき約0.1～100mg、好ましくは0.1～50mgである。非経口投与の場合、注射剤の形では、1日につき0.01～50mg、好ましくは0.01～10mgである。

実施例

以下に実施例により本発明を詳述するが、本発明は該実施例によって限定されるものではない。なお、特に断りがない場合は、公知の方法 (Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor

Laboratory, NY, 1989) 等の遺伝子操作実験マニュアルや試薬等に添付のマニュアルに従った。

(実施例 1) 新規オキシダーゼ NOX1-b の取得と全長オープンリーディングフレーム (open reading frame、ORF) 配列の決定

キアゲン社の RNA 抽出キット (RNAeasy Protect Mini Kit) を用いて東洋紡績社の RA 患者由来滑膜細胞 (HS-RA) より mRNA を精製し、スーパースクリプト II (SUPERScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR) (Gibco-BRL 社) を用い cDNA に転換することにより作製した自家製の cDNA を鋳型とした。配列番号 3 と配列番号 4 で表される NOX1 の ORF の外側をコードするオリゴ DNA を合成し、DNA ポリメラーゼ (PLATINUM™ Taq DNA polymerase ; インビトロジェン社) を用いて、94℃1 分の後、94℃30 秒、55℃30 秒、68℃3 分のサイクルを 35 回の PCR 反応を行った。この反応により得られた cDNA をクローニングベクター (TA クローニングキット ; インビトロジェン社) に挿入 (NOX1 ベクター) し、ジデオキシターミネーター法により ABI3700 DNA シークエンサー (アプライドバイオシステムズ社) で解析し、ORF 配列を決定した。この遺伝子を NOX1-b と名付けた。該遺伝子の全長塩基配列を配列番号 1 に、推定アミノ酸配列を配列番号 2 に示した。NOX1-b の ORF 配列は NOX1 (Genbank アクセッション番号 : AF127763) の第 433 番目から第 481 番目までがスプライシングアウトされた新規蛋白質をコードしていた。

(実施例 2) NOX1-b 全長 ORF のクローニングと蛋白質発現プラスミドの構築

実施例 1 で作製した NOX1-b ベクターを EcoRI、XhoI で切断し、蛋白質発現ベクター (pcDNA3.1/HisB ; インビトロジェン社) の EcoRI、XhoI 部位に挿入して、全長蛋白質発現プラスミド pcDNA3.1/HisB・NOX1-b を完成した。

(実施例 3) HisB・NOX1-b の動物細胞株での発現

10cm プレートに NIH3T3 細胞 (大日本製薬社) を 1×10^6 細胞でプレーティングして 12 時間培養後、実施例 2 において作製した発現プラスミド pcDNA3.1/HisB・NOX1-b 及び空ベクター pcDNA3.1/HisB を、トランスフェクション試薬 (FuGENE™6 Transfection Reagent ; ロシュ社製) を用いて添付指示書に従い、NIH3T3 細胞に導入した。プラスミド導入後 12-16 時間で培地を無血清に置換した後、さらに 48-

60 時間培養を継続した。導入細胞を PBS で洗浄後、SDS サンプルバッファー (S.B) で回収した。S.B 中に目的蛋白質が存在することを NOX1 蛋白質と NOX1-b 蛋白質共通の C 末端配列をエピトープとして認識する抗体 (ウサギ抗 MOX 抗体; サンタクルズ社製) を用いたウエスタンブロッティングで確認した。すなわち、回収した上記 S.B を SDS/4%~20% アクリルアミドゲル (第一化学薬品社) に電気泳動 (還元条件) 後、ブロッティング装置を用いて PVDF 膜 (ミリポア社) に転写した。転写後の PVDF 膜にブロックエース (大日本製薬社) を添加してブロッキングした後、ビオチン化ウサギ抗 IgG 抗体 (M2; シグマ社)、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (アマシャムファルマシア社製) を順次反応させた。反応後、ECL ウエスタンブロッティング検出システム (アマシャムファルマシア社) を用いて目的蛋白の発現を確認した。pcDNA3.1/HisB・NOX1-b 導入細胞より得たサンプルには、分子量 52 ± 0.5 kD のバンドが検出されたが、空ベクター導入細胞より得たサンプルにはバンドは検出されず、pcDNA3.1/HisB・NOX1-b 導入細胞で HisB・NOX1-b が発現していることがわかった。

(実施例 4) RA 患者由来滑膜細胞における NOX1-b mRNA の発現上昇

実施例 1 で示した mRNA 抽出法を用いて、大日本製薬社の健常人由来滑膜細胞 (Cell System-SS cells) から自家製の cDNA を作製した。配列番号 5 と配列番号 6 で表される NOX1-b 特異的な配列をコードするプローブプライマーを合成し、RA 患者、健常人由来の各サンプル (各鋳型 cDNA を 1、1/10、1/100 の希釈倍率で希釈したもの) に対して DNA ポリメラーゼ (rTaq DNA polymerase; 東洋紡績社) を用いて、94°C 1 分の後、94°C 10 秒、55°C 20 秒、72°C 30 秒のサイクルを 45 回の半定量的 RT-PCR 反応を行った。配列番号 5 で表されるプライマー配列は、NOX1 がスプライシングアウトされた接続部位、すなわち NOX1 蛋白質の第 432 番目と第 482 番目を接続した部位をコードするヌクレオチド配列であり、よって NOX1 を認識しない配列である。従って、配列番号 5 と配列番号 6 による PCR 産物は NOX1-b 特異的なものである。PCR 反応物をアガロースゲルに電気泳動し、エチジウムブロマイド (EtBr) 染色により DNA を検出したところ、NOX1-b と予想されるサイズのバンドが RA 患者由来のサンプルでは認められたが、健常人のサンプルでは認めることができなかった。一方、コントロールである、配列番号 7 と配列番号 8 で表される

プライマーを用いたグリセルアルデヒド三リン酸脱水素酵素 (G3PDH) のPCR反応においては、RA患者、健常人サンプル共に同様なEtBr染色によるバンドが認められた (図1A)。また配列番号13と配列番号6で表される既知のNOX1特異的な配列をコードするプローブプライマーを用い、上記と同様にRA患者及び健常人由来の各サンプルを用いてRT-PCR反応を行い、NOX1-b特異的プローブプライマーを用いたデータと比較した。その結果、NOX1-bとは異なり、NOX1と予想されるサイズのバンドはRA患者由来のサンプルだけではなく、健常人由来のサンプルでも検出された。また、RA患者由来のサンプルと健常人由来のサンプルとでEtBrで染色されるNOX1のバンド量に変化は認められなかった (図1B)。これらのことより、健常人に対し、RA患者由来滑膜細胞において、NOX1-b発現量が有意に亢進していることが明らかとなった。また、本実施例記載の方法でRA診断の検査が可能であることがわかった。

(実施例5) NOX1-b の ROS 産生活性

実施例3で示した NOX1-b 発現細胞を用いてシトクロム C 還元法により ROS 産生能を測定した。シトクロム C 還元法により ROS を測定するために空ベクター発現細胞と NOX1-b 発現細胞を 96 穴の細胞培養用マルチウェルプレート (マルチウェルプレートと略す) に 0.5×10^6 個/100 μ l/穴の割合で撒いた。約 12 時間後に各条件下において 4.62 mg/ml のシトクロム C を 100 μ l/穴加えて混合した後マルチウェルプレートをプレートリーダーにセットし、550 nm の吸光度を経時的に測定した。1 時間後の積算値を図2に示した。その結果 NOX1-b 発現細胞においては空ベクター発現細胞に比べ顕著な ROS 産生活性を有することが明らかになった。またこの活性は、NADPH Oxidase 阻害剤として知られる Diphenylene Iodonium Chloride (DPI と略す) 1 μ M をシトクロム C 添加の 30 分前に加えることにより大きく抑制されることがわかった (図2)。これらのことにより NOX1-b は ROS 産生活性を有し、その活性は DPI により阻害されることが明らかになった。本実施例の測定法により、NOX1-b の活性を抑制する物質をスクリーニングすることができる。

(実施例6) NOX1-b 発現細胞における COX-2 mRNA の発現上昇

実施例1で示したmRNA抽出法を用いて、空ベクター発現細胞及びNOX1-b発現細胞

胞から各々cDNAを作製した。配列番号9と配列番号10で表されるCOX-2特異的な配列をコードするプローブプライマーを合成し、空ベクター発現細胞、NOX1-b発現細胞由来の各サンプルに対してDNAポリメラーゼ (rTaq DNA polymerase ; 東洋紡績社) を用いて、94°C1分の後、94°C10秒、55°C20秒、72°C30秒のサイクルを45回のRT-PCR反応を行った。PCR反応物をアガロースゲルに電気泳動し、EtBr染色によりDNAを検出したところ、COX-2と予想されるサイズのバンドが空ベクター由来のサンプルよりもNOX1-b由来のサンプルで著しく上昇することが確認できた(図3)。一方、コントロールである、配列番号7と配列番号8で表されるプライマーを用いたG3PDHのPCR反応においては空ベクター発現細胞、NOX1-b発現細胞由来のサンプル共に同様なEtBr染色によるバンドが認められた(図3)。したがって空ベクター発現細胞に対し、NOX1-b発現細胞はCOX-2発現量が有意に亢進していることが明らかとなった。

NOX1-b阻害剤であるDPIを終濃度1 μ MとなるようにNOX1-b発現細胞に添加し、3時間後にmRNA抽出法にて調製したサンプルを用いて上記と同様のRT-PCRを行ったところ、NOX1-b発現によるCOX-2発現誘導がDPIにより阻害されることが明らかになった(図3)。COX-2発現誘導がDPIにより阻害されたことから、NOX1-b由来のROSによる酸化還元制御を介してCOX-2が発現誘導されたと考えられた。

(実施例7) NOX1-b発現細胞におけるTNF α mRNAの発現上昇

配列番号11と配列番号12で表されるTNF α 特異的な配列をコードするプローブプライマーを合成し、実施例6で調製した各cDNAサンプルに対してDNAポリメラーゼ (rTaq DNA polymerase ; 東洋紡績社) を用いて、94°C1分の後、94°C10秒、55°C20秒、72°C30秒のサイクルを45回のRT-PCR反応を行った。PCR反応物をアガロースゲルに電気泳動し、EtBr染色によりDNAを検出したところ、TNF α と予想されるサイズのバンドがNOX1-b発現細胞由来のサンプルでは確認できたが、空ベクター発現細胞由来のサンプルにおいては認めることができなかった。一方、コントロールである、配列番号7と配列番号8で表されるプライマーを用いたG3PDHのPCR反応においては空ベクター発現細胞、NOX1-b発現細胞由来のサンプル共に同様なEtBr染色によるバンドが認められた。さらに、NOX1-b由来細胞に対しNOX1-b阻害剤であるDPIを1 μ M、3時間前処理するとTNF α 発現誘導が阻害される

ことが明らかになった(図4)。したがって空ベクター発現細胞に対し、NOX1-b発現細胞はTNF α 発現量が有意に亢進していることが明らかとなった。また、このTNF α 発現誘導はDPIにより阻害されることから、NOX1-b由来のROSによる酸化還元制御を介して行われていることが考えられる。

産業上の利用可能性

本発明のポリヌクレオチドは、その発現亢進が病態と結びついていることから、RA診断の指標となることが解かった。本発明のポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドによってコードされる本発明のポリペプチドの発現を指標にすることによりRA診断の検査を行うことが可能となった。また、本発明は、RA患者由来滑膜細胞に特異的に発現する新規オキシダーゼを提供するものであり、その特異的なプライマー配列を用いたPCRによりRA診断の検査へ応用できることが期待される。本発明のスクリーニング方法は、RA治療用物質及び／又は変形性関節炎治療用物質のスクリーニングに有用である。

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

請 求 の 範 囲

1. (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、関節リウマチ患者特異的に発現するポリペプチド、あるいは、(2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が欠失、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、関節リウマチ患者特異的に発現するポリペプチド。
2. 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。
3. 請求の範囲1または、請求の範囲2に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。
4. 請求の範囲3に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。
5. 請求の範囲4に記載の発現ベクターで形質転換された細胞。
6. (1) 被験者における、
 - i) 請求の範囲3に記載の塩基配列を含む遺伝子、又は
 - ii) 配列番号2で表されるアミノ酸配列との相同性が95%以上であるアミノ酸配列を含み、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列を含む遺伝子の発現レベルを測定する工程、及び(2) 健常者における前記遺伝子の発現レベルと比較する工程を含むことを特徴とする、関節リウマチの検査方法。
7. i) 請求の範囲3に記載の塩基配列を含む遺伝子、又は
 - ii) 配列番号2で表されるアミノ酸配列との相同性が95%以上であるアミノ酸配列を含み、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列を含む遺伝子を特異的に増幅できるように設計した順方向及び逆方向プライマーを含む関節リウマチ検査用キット。
8. (1) 請求の範囲1若しくは請求の範囲2に記載のポリペプチド、又は配列番号2で表されるアミノ酸配列との相同性が95%以上であるアミノ酸配列を含み、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチドを発現している細胞に試験物質を接触させる工程、(2) 前記ポリペプチドの活性が抑制されるか否かを分析する

工程、及び（３）前記ポリペプチドの活性を抑制する物質を選択する工程を含むことを特徴とする、前記ポリペプチドの活性を抑制する物質をスクリーニングする方法。

9. 請求の範囲 1 若しくは請求の範囲 2 に記載のポリペプチド、又は配列番号 2 で表されるアミノ酸配列との相同性が 95% 以上であるアミノ酸配列を含み、しかも、RA 患者特異的に発現するポリペプチドの活性を抑制する物質が関節リウマチ治療用物質及び／又は変形性関節炎治療用物質である、請求の範囲 8 記載のスクリーニングする方法。

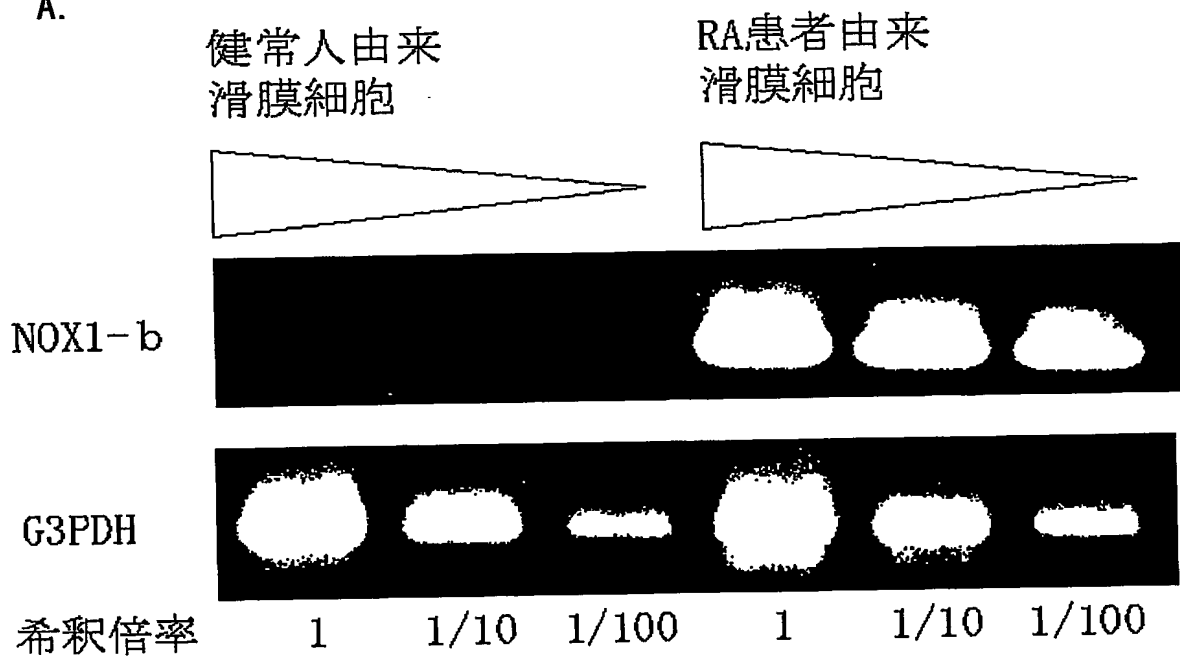
10. 請求の範囲 8 又は請求の範囲 9 に記載のスクリーニング方法を用いてスクリーニングする工程、及び

前記スクリーニングにより得られた物質を用いて製剤化する工程

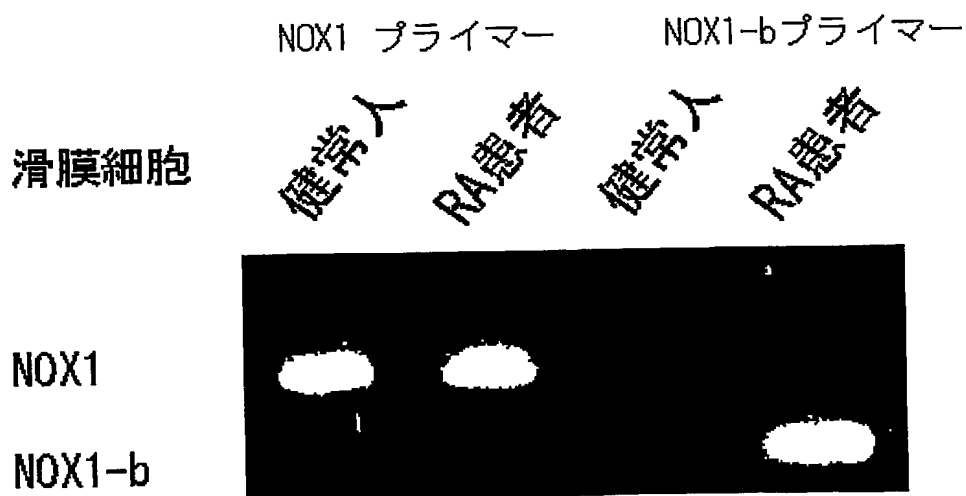
を含むことを特徴とする、RA 治療用及び／又は変形性関節炎治療用医薬組成物の製造方法。

図 1.

A.



B.



2/3

図 2.

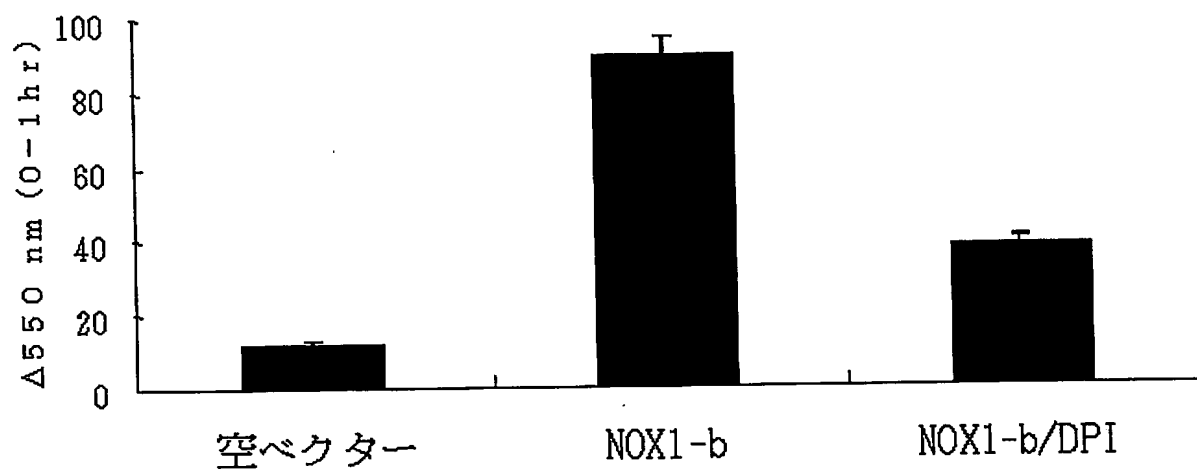
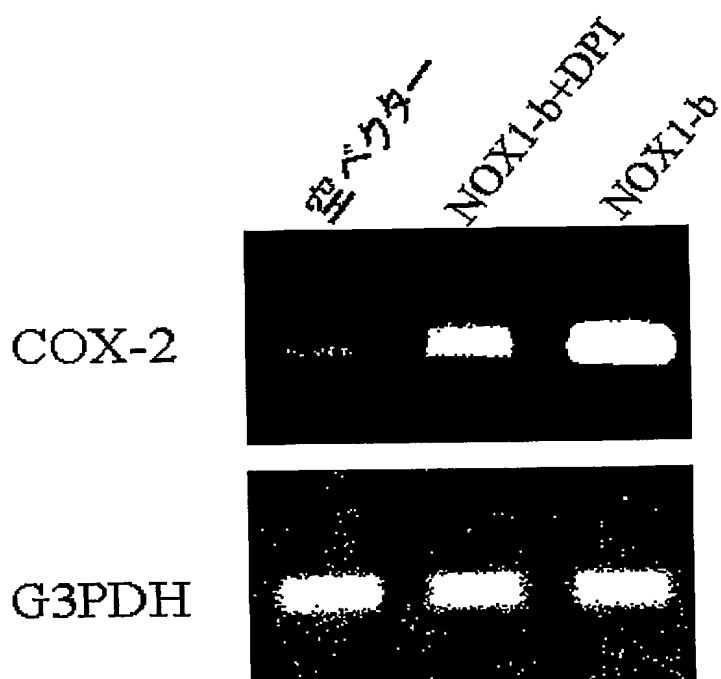
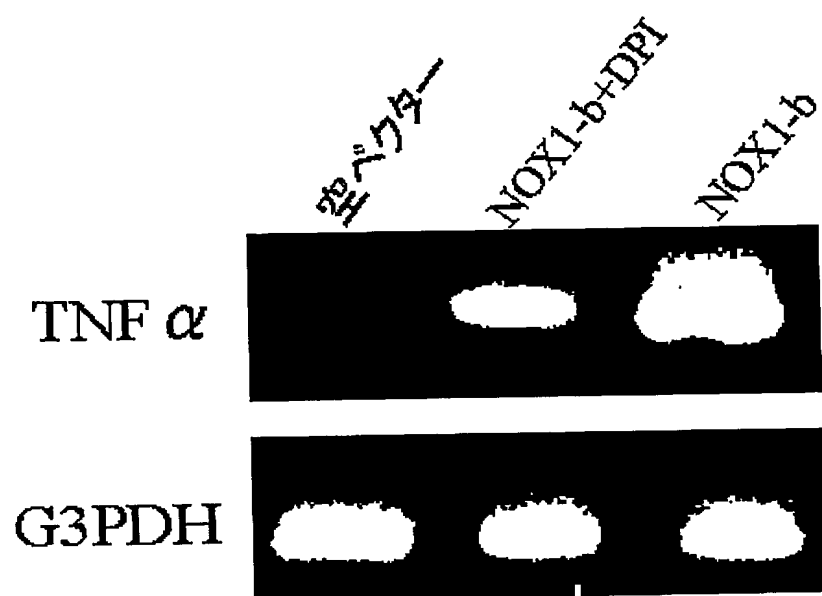


図 3.



3/3

図 4.



SEQUENCE LISTING

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd

<120> Novel oxidase

<130> Y0321-PCT

<150> JP2002-165612

<151> 2002-06-06

<150> JP2002-060749

<151> 2003-03-07

<160> 13

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1548

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1548)

<223> Inventor: Kawakami, Masakatsu

<400> 1

atg gga aac tgg gtg gtt aac cac tgg ttt tca gtt ttg ttt ctg gtt
Met Gly Asn Trp Val Val Asn His Trp Phe Ser Val Leu Phe Leu Val
1 5 10 15

48

gtt tgg tta ggg ctg aat gtt ttc ctg ttt gtg gat gcc ttc ctg aaa
Val Trp Leu Gly Leu Asn Val Phe Leu Phe Val Asp Ala Phe Leu Lys

96

2/12

20	25	30	
tat gag aag gcc gac aaa tac tac tac aca aga aaa atc ctt ggg tca			144
Tyr Glu Lys Ala Asp Lys Tyr Tyr Tyr Thr Arg Lys Ile Leu Gly Ser			
35	40	45	
aca ttg gcc tgt gcc cga gcg tct gct ctc tgc ttg aat ttt aac agc			192
Thr Leu Ala Cys Ala Arg Ala Ser Ala Leu Cys Leu Asn Phe Asn Ser			
50	55	60	
acg ctg atc ctg ctt cct gtg tgt cgc aat ctg ctg tcc ttc ctg agg			240
Thr Leu Ile Leu Leu Pro Val Cys Arg Asn Leu Leu Ser Phe Leu Arg			
65	70	75	80
ggc acc tgc tca ttt tgc agc cgc aca ctg aga aag caa ttg gat cac			288
Gly Thr Cys Ser Phe Cys Ser Arg Thr Leu Arg Lys Gln Leu Asp His			
85	90	95	
aac ctc acc ttc cac aag ctg gtg gcc tat atg atc tgc cta cat aca			336
Asn Leu Thr Phe His Lys Leu Val Ala Tyr Met Ile Cys Leu His Thr			
100	105	110	
gct att cac atc att gca cac ctg ttt aac ttt gac tgc tat agc aga			384
Ala Ile His Ile Ile Ala His Leu Phe Asn Phe Asp Cys Tyr Ser Arg			
115	120	125	
agc cga cag gcc aca gat ggc tcc ctt gcc tcc att ctc tcc agc cta			432
Ser Arg Gln Ala Thr Asp Gly Ser Leu Ala Ser Ile Leu Ser Ser Leu			
130	135	140	
tct cat gat gag aaa aag ggg ggt tct tgg cta aat ccc atc cag tcc			480
Ser His Asp Glu Lys Lys Gly Gly Ser Trp Leu Asn Pro Ile Gln Ser			
145	150	155	160
cga aac acg aca gtg gag tat gtg aca ttc acc agc gtt gct ggt ctc			528
Arg Asn Thr Thr Val Glu Tyr Val Thr Phe Thr Ser Val Ala Gly Leu			

3/12

165	170	175	
act gga gtg atc atg aca ata gcc ttg att ctc atg gta act tca gct			576
Thr Gly Val Ile Met Thr Ile Ala Leu Ile Leu Met Val Thr Ser Ala			
180	185	190	
act gag ttc atc cgg agg agt tat ttt gaa gtc ttc tgg tat act cac			624
Thr Glu Phe Ile Arg Arg Ser Tyr Phe Glu Val Phe Trp Tyr Thr His			
195	200	205	
cac ctt ttt atc ttc tat atc ctt ggc tta ggg att cac ggc att ggt			672
His Leu Phe Ile Phe Tyr Ile Leu Gly Leu Gly Ile His Gly Ile Gly			
210	215	220	
gga att gtc cgg ggt caa aca gag gag agc atg aat gag agt cat cct			720
Gly Ile Val Arg Gly Gln Thr Glu Glu Ser Met Asn Glu Ser His Pro			
225	230	235	240
cgc aag tgt gca gag tot ttt gag atg tgg gat gat cgt gac tcc cac			768
Arg Lys Cys Ala Glu Ser Phe Glu Met Trp Asp Asp Arg Asp Ser His			
245	250	255	
tgt agg cgc cct aag ttt gaa ggg cat ccc cct gag tot tgg aag tgg			816
Cys Arg Arg Pro Lys Phe Glu Gly His Pro Pro Glu Ser Trp Lys Trp			
260	265	270	
atc ctt gca ccg gtc att ctt tat atc tgt gaa agg atc ctc cgg ttt			864
Ile Leu Ala Pro Val Ile Leu Tyr Ile Cys Glu Arg Ile Leu Arg Phe			
275	280	285	
tac cgc tcc cag cag aag gtt gtg att acc aag gtt gtt atg cac cca			912
Tyr Arg Ser Gln Gln Lys Val Val Ile Thr Lys Val Val Met His Pro			
290	295	300	
tcc aaa gtt ttg gaa ttg cag atg aac aag cgt ggc ttc agc atg gaa			960
Ser Lys Val Leu Glu Leu Gln Met Asn Lys Arg Gly Phe Ser Met Glu			

4/12

305	310	315	320	
gtg ggg cag tat atc ttt gtt aat tgc ccc tca atc tct ctc ctg gaa				1008
Val Gly Gln Tyr Ile Phe Val Asn Cys Pro Ser Ile Ser Leu Leu Glu				
	325	330	335	
tgg cat cct ttt act ttg acc tct gct cca gag gaa gat ttc ttc tcc				1056
Trp His Pro Phe Thr Leu Thr Ser Ala Pro Glu Glu Asp Phe Phe Ser				
	340	345	350	
att cat atc cga gca gca ggg gac tgg aca gaa aat ctc ata agg gct				1104
Ile His Ile Arg Ala Ala Gly Asp Trp Thr Glu Asn Leu Ile Arg Ala				
	355	360	365	
ttc gaa caa caa tat tca cca att ccc agg att gaa gtg gat ggt ccc				1152
Phe Glu Gln Gln Tyr Ser Pro Ile Pro Arg Ile Glu Val Asp Gly Pro				
	370	375	380	
ttt ggc aca gcc agt gag gat gtt ttc cag tat gaa gtg gct gtg ctg				1200
Phe Gly Thr Ala Ser Glu Asp Val Phe Gln Tyr Glu Val Ala Val Leu				
	385	390	395	400
gtt gga gca gga att ggg gtc acc ccc ttt gct tct atc ttg aaa tcc				1248
Val Gly Ala Gly Ile Gly Val Thr Pro Phe Ala Ser Ile Leu Lys Ser				
	405	410	415	
atc tgg tac aaa ttc cag tgt gca gac cac aac ctc aaa aca aaa aag				1296
Ile Trp Tyr Lys Phe Gln Cys Ala Asp His Asn Leu Lys Thr Lys Lys				
	420	425	430	
gtt ggt cat gca gca tta aac ttt gac aag gcc act gac atc gtg aca				1344
Val Gly His Ala Ala Leu Asn Phe Asp Lys Ala Thr Asp Ile Val Thr				
	435	440	445	
ggg ctg aaa cag aaa acc tcc ttt ggg aga cca atg tgg gac aat gag				1392
Gly Leu Lys Gln Lys Thr Ser Phe Gly Arg Pro Met Trp Asp Asn Glu				

450

460

tta tgt ggc cct cgg act ttg gca aag agc ctg cgc aaa tgc tgt cac 1488
Leu Cys Gly Pro Arg Thr Leu Ala Lys Ser Leu Arg Lys Cys Cys His
485 490 495

gaa aat ttt tga 1548
Glu Asn Phe
515

<210>	2
<211>	515
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Asn Trp Val Val Asn His Trp Phe Ser Val Leu Phe Leu Val
1 5 10 15

Val Trp Leu Gly Leu Asn Val Phe Leu Phe Val Asp Ala Phe Leu Lys
20 25 30

Tyr Glu Lys Ala Asp Lys Tyr Tyr Tyr Thr Arg Lys Ile Leu Gly Ser
35 40 45

6/12

Thr Leu Ala Cys Ala Arg Ala Ser Ala Leu Cys Leu Asn Phe Asn Ser
50 55 60

Thr Leu Ile Leu Leu Pro Val Cys Arg Asn Leu Leu Ser Phe Leu Arg
65 70 75 80

Gly Thr Cys Ser Phe Cys Ser Arg Thr Leu Arg Lys Gln Leu Asp His
85 90 95

Asn Leu Thr Phe His Lys Leu Val Ala Tyr Met Ile Cys Leu His Thr
100 105 110

Ala Ile His Ile Ile Ala His Leu Phe Asn Phe Asp Cys Tyr Ser Arg
115 120 125

Ser Arg Gln Ala Thr Asp Gly Ser Leu Ala Ser Ile Leu Ser Ser Leu
130 135 140

Ser His Asp Glu Lys Lys Gly Gly Ser Trp Leu Asn Pro Ile Gln Ser
145 150 155 160

Arg Asn Thr Thr Val Glu Tyr Val Thr Phe Thr Ser Val Ala Gly Leu
165 170 175

Thr Gly Val Ile Met Thr Ile Ala Leu Ile Leu Met Val Thr Ser Ala
180 185 190

7/12

Thr Glu Phe Ile Arg Arg Ser Tyr Phe Glu Val Phe Trp Tyr Thr His
195 200 205

His Leu Phe Ile Phe Tyr Ile Leu Gly Leu Gly Ile His Gly Ile Gly
210 215 220

Gly Ile Val Arg Gly Gln Thr Glu Glu Ser Met Asn Glu Ser His Pro
225 230 235 240

Arg Lys Cys Ala Glu Ser Phe Glu Met Trp Asp Asp Arg Asp Ser His
245 250 255

Cys Arg Arg Pro Lys Phe Glu Gly His Pro Pro Glu Ser Trp Lys Trp
260 265 270

Ile Leu Ala Pro Val Ile Leu Tyr Ile Cys Glu Arg Ile Leu Arg Phe
275 280 285

Tyr Arg Ser Gln Gln Lys Val Val Ile Thr Lys Val Val Met His Pro
290 295 300

Ser Lys Val Leu Glu Leu Gln Met Asn Lys Arg Gly Phe Ser Met Glu
305 310 315 320

Val Gly Gln Tyr Ile Phe Val Asn Cys Pro Ser Ile Ser Leu Leu Glu
325 330 335

8/12

Trp His Pro Phe Thr Leu Thr Ser Ala Pro Glu Glu Asp Phe Phe Ser
340 345 350

Ile His Ile Arg Ala Ala Gly Asp Trp Thr Glu Asn Leu Ile Arg Ala
355 360 365

Phe Glu Gln Gln Tyr Ser Pro Ile Pro Arg Ile Glu Val Asp Gly Pro
370 375 380

Phe Gly Thr Ala Ser Glu Asp Val Phe Gln Tyr Glu Val Ala Val Leu
385 390 395 400

Val Gly Ala Gly Ile Gly Val Thr Pro Phe Ala Ser Ile Leu Lys Ser
405 410 415

Ile Trp Tyr Lys Phe Gln Cys Ala Asp His Asn Leu Lys Thr Lys Lys
420 425 430

Val Gly His Ala Ala Leu Asn Phe Asp Lys Ala Thr Asp Ile Val Thr
435 440 445

Gly Leu Lys Gln Lys Thr Ser Phe Gly Arg Pro Met Trp Asp Asn Glu
450 455 460

Phe Ser Thr Ile Ala Thr Ser His Pro Lys Ser Val Val Gly Val Phe
465 470 475 480

9/12

Leu Cys Gly Pro Arg Thr Leu Ala Lys Ser Leu Arg Lys Cys Cys His
485 490 495

Arg Tyr Ser Ser Leu Asp Pro Arg Lys Val Gln Phe Tyr Phe Asn Lys
500 505 510

Glu Asn Phe
515

<210> 3
<211> 28
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
gaagggtcc aaaccacctc ttgacaat 28

<210> 4
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 4
aaaatgcaga ttaccgtcct tattccttaa 30

<210> 5
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo sapiens

10/12

<400> 5
aaaacaaaa aggttggtca tgcagca 27

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6
tcaaaaaattt totttgttga a 21

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7
accacagtcc atgccatcac 20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 8
tccaccaccc tgttgctgta 20

<210> 9
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

11/12

<400> 9
attgcctctg aattcaaca 19

<210> 10
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 10
agtattgatg atcttaaa 18

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 11
ttgtaccttg tctactccca 20

<210> 12
<211> 19
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 12
acagagcaat gactccaaa 19

<210> 13
<211> 25
<212> DNA
<213> Homo sapiens

12/12

<400> 13

aaaacaaaaa agatctatct ctact

25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07148

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10,
C12N9/04, C12Q1/68, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10,
C12N9/04, C12Q1/68, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTplus (JOIS),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01/96390 A2 (CORIXA CORP.), 20 December, 2001 (20.12.01), Sequence Nos. 1, 2, 21, 22, 41, 42; Claims & AU 200169766 A & US 2002/0040127 A1 & US 2003/0017167 A1 & EP 1287029 A2	1-5, 7-9
A	WO 00/28031 A2 (UNIV. EMORY), 18 May, 2000 (18.05.00), Sequence Nos. 244, 245; Claims & AU 200019118 A & EP 1131430 A2	1-5, 7-9
A	WO 02/06515 A2 (DIADEXUS INC.), 24 January, 2002 (24.01.02), Sequence Nos. 1, 2, 84; Claims & AU 200222944 A & EP 1313875 A2	1-5, 7-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
25 July, 2003 (25.07.03)

Date of mailing of the international search report
12 August, 2003 (12.08.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07148

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BABFI, B. et al., A mammalian H ⁺ channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOH-1. Science, (2002), Vol.287, No.5450, pages 138 to 142	1-5, 7-9
A	Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. Nature, (1999), Vol.401, No.6748, pages 79 to 82	1-5, 7-9
P, A	WO 02/81703 A2 (CHENG G.), 17 October, 2002 (17.10.02), Sequence No. 14; Claims & US 2002/0176852 A1	1-5, 7-9
P, A	WO 02/103028 A2 (BARANOVA A.V.), 27 December, 2002 (27.12.02), Sequence No. 174; Claims & US 2003/0108890 A1	1-5, 7-9
A	OSTRAKHOVITCH, EA. et al., Oxidative stress in rheumatoid arthritis leukocytes: suppression by rutin and other antioxidants and chelators. Biochem. Pharmacol., (2002), Vol.62, No.6, Pages 743 to 746	1-5, 7-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07148

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 6

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 6 pertains to methods for treatment of the human body by therapy or diagnostic methods and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) (continued to extra sheet)

2. ☒ Claims Nos.: 10

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Concerning "a substance obtained by the above screening method" as described in the above claim, it is completely unknown what specific compounds are involved in the scope thereof and what are not. Thus, this claim is described in an extremely unclear manner. (continued to extra sheet)

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07148

Continuation of Box No.I-1 of continuation of first sheet(1)

of the Regulations under the PCT, to search.

Continuation of Box No.I-2 of continuation of first sheet(1)

Such being the case, no meaningful international search can be made on the above claim.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 15/09, C12N 1/15, C12N 1/19, C12N 1/21, C12N 5/10, C12N 9/04, C12Q 1/68, G01N 33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 15/09, C12N 1/15, C12N 1/19, C12N 1/21, C12N 5/10, C12N 9/04, C12Q 1/68, G01N 33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTplus (JOIS), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq,
SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 01/96390 A2 (CORIXA CORP) 2001. 12. 20, 配列番号1, 2, 21, 22, 41, 42, 特許請求の範囲 & AU 200169766 A & US 2002/0040127 A1 & US 2003/0017167 A1 & EP 1287029 A2	1-5, 7-9
A	WO 00/28031 A2 (UNIV EMORY) 2000. 05. 18, 配列番号244, 245, 特許請求の範囲 & AU 200019118 A & EP 1131430 A2	1-5, 7-9
A	WO 02/06515 A2 (DIADEXUS INC) 2002. 01. 24, 配列番号1, 2, 84, 特許請求の範囲 & AU 200222944 A & EP 1313875 A2	1-5, 7-9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25. 07. 03

国際調査報告の発送日

12.08.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長井 啓子



4N 3038

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	BABFI, B. et al., A mammalian H ⁺ channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOX-1. Science(2000) Vol. 287, No. 5450, p. 138-142	1-5, 7-9
A	Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. Nature(1999) Vol. 401, No. 6748, p. 79-82	1-5, 7-9
P, A	WO 02/81703 A2 (CHENG G) 2002. 10. 17, 配列番号14, 特許請求の範囲 & US 2002/0176852 A1	1-5, 7-9
P, A	WO 02/103028 A2 (BARANOVA A V) 2002. 12. 27, 配列番号174, 特許請求の範囲 & US 2003/0108890 A1	1-5, 7-9
A	OSTRAKHOVITCH, EA. et al., Oxidative stress in rheumatoid arthritis leukocytes: suppression by rutin and other antioxidants and chelators. Biochem Pharmacol. (2001) Vol. 62, No. 6, p. 743-746	1-5, 7-9

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT第17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 6 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、
前記請求の範囲の発明は、人の身体の治療方法又は診断方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☒ 請求の範囲 10 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
前記請求の範囲に記載の「前期スクリーニング方法により得られた物質」について、具体的にはどのような化合物が包含され、どのような化合物が包含されないのが全く不明であるから、前記請求の範囲の記載は著しく不明確である。したがって、前記請求の範囲については、有意義な国際調査をすることができない。
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。